



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Joellington Marinho de Almeida

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM LEITES
FERMENTADOS COMERCIAIS

JOÃO PESSOA

2017

JOELLINGTON MARINHO DE ALMEIDA

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM LEITES
FERMENTADOS COMERCIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Engenharia de Alimentos do
Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba,
como parte dos requisitos para obtenção do Título de
Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Janeeyre Ferreira Maciel

JOÃO PESSOA

2017

JOELLINGTON MARINHO DE ALMEIDA

**VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM LEITES
FERMENTADOS COMERCIAIS**

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Janeeyre Ferreira Maciel

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade
Federal da Paraíba, UFPB

Orientador (a)

Prof.^a Dr.^a Edilma Pinto Coutinho

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade
Federal da Paraíba, UFPB

Examinador

Prof.^a Dr.^a Esmeralda Paranhos dos Santos

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade
Federal da Paraíba, UFPB

Examinador

JOÃO PESSOA

2017

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, meus familiares, amigos e todos os professores que fizeram parte da
minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder forças e me sustentar durante toda trajetória, guiando meu caminho, fazendo com que não perdesse o foco de um sonho que hoje se torna realidade.

Aos meus pais, Almaiza Marinho Pachêco e José Antônio de Almeida, pela educação e por sempre terem acreditado em mim, pelo apoio que me concederam em minhas escolhas e por terem sonhado junto comigo, sendo grandes incentivadores de minhas conquistas, trazendo-lhes orgulho. Sendo eternamente grato a vocês.

As minhas irmãs, Joseane Marinho de Almeida e Josemary Marinho de Almeida, pelo companheirismo e apoio.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Janeeyre Ferreira Maciel, por todo conhecimento, crescimento profissional, paciência e carinho durante minha graduação.

Aos Profs. Drs. Pierre Côrrea Martins, por ter me orientado em projetos de extensão, e Ricardo Targino Moreira em programas de monitoria e iniciação científica, conhecimento adquirido, paciência e a grande amizade.

As pessoas que considero além da amizade, Amanda Silva do Carmo, Amanda Gomes, Carolina Zanini, Thálita Cristyne de Oliveira Alves, Maeli Avelino de Sousa Barros, Matheus Arthur e Isabel Almeida por todo carinho, companheirismo, incentivo, preocupação, me apoiando e sempre estando ao meu lado.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para que tudo que almejei pudesse ser escrito em mais um capítulo de minha vida.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de reolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Os leites fermentados são produtos obtidos mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos e/ou outras bactérias lácticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final. Alguns desses microrganismos são considerados probióticos por conferirem benefícios à saúde, quando consumidos em quantidades adequadas diariamente. Estas bactérias devem se manterem viáveis em todo tempo de vida útil do produto, trazendo os benefícios que são alegados em suas embalagens. O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade de bactérias lácticas probióticas em três leites fermentados comerciais a fim de se atestar que os mesmos continham a quantidade mínima desses microrganismos alegados em seus rótulos e/ou exigida pela legislação brasileira. Para isso, foi realizada a contagem de bactérias lácticas totais em placas através da técnica de plaqueamento em profundidade, utilizando-se o ágar MRS. O mesmo ágar foi utilizado como cobertura, afim de criar uma atmosfera microaeróbica. Ainda, foram determinados os parâmetros de pH e acidez. Todas as amostras de leites fermentados continham bactérias lácticas em números acima de 10^7 ufc/mL, indicando adequação quanto aos requisitos avaliados. Uma das três marcas ainda fez alegação em conter mais microrganismos, na ordem de 10^{10} ufc/mL, enquanto que, outra não alegava a presença de bactérias probióticas, porém, indicava a presença de lactobilos vivos no produto. A acidez das amostras variou de 1,0% a 1,57% de ácido láctico, de acordo com a legislação brasileira, os limites estabelecidos são mínimo de 0,6 e máximo de 2% de ácido láctico estando dentro das exigências da legislação. Com relação ao pH, os valores observados variaram de 3,5 a 4,0, intervalo considerado adequado para esse tipo de produto, e com valores próximos dos relatados por outros autores.

Palavras chave: Produto lácteo; Legislação; Probióticos; Acidez.

ABSTRACT

Fermented milks are products obtained through the action of cultures of specific microorganisms and / or other lactic bacteria that, by their activity, contribute to the determination of the characteristics of the final product. Some of these microorganisms are considered probiotic because they confer health benefits when consumed in adequate amounts daily. These bacteria should remain viable throughout the shelf life of the product, bringing the benefits that are claimed in their packaging. The objective of this work was to evaluate the viability of probiotic lactic bacteria in three commercial fermented milks in order to certify that they contained the minimum quantity of these microorganisms alleged in their labels and / or required by Brazilian legislation. For this, total lactic acid bacteria were counted in plates by the depth plating technique, using MRS agar. The same agar was used as cover in order to create a microaerobic atmosphere. Also, pH and acidity parameters were determined. All fermented milk samples contained lactic acid bacteria in numbers above 10^7 cfu / mL, indicating suitability for the evaluated requirements. One of the three brands still made a claim to contain more microorganisms, in the order of 10^{10} cfu / mL, while another did not allege the presence of probiotic bacteria, but indicated the presence of live lactobacilli in the product. The acidity of the samples varied from 1.0% to 1.57% of lactic acid, according to the Brazilian legislation, the limits established are minimum of 0.6 and maximum of 2% of lactic acid being within the requirements of the legislation. Regarding pH, the observed values ranged from 3.5 to 4.0, range considered adequate for this type of product, and values close to those reported by other authors.

key-words: Dairy products; Legislation; Probiotics; Acidity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 OBJETIVOS.....	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivo Geral.....	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos Específicos	Erro! Indicador não definido.
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 Leites Fermentados	12
3.2 Bactérias lácticas.....	12
3.3 Fatores que influenciam na viabilidade das bactérias lácticas.....	14
4. ARTIGO CIENTIFICO.....	15
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 COLETA DAS AMOSTRAS	16
2.2 DETERMINAÇÃO DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) E ACIDEZ .	16
2.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁCTICAS TOTAIS	17
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 DETERMINAÇÃO DE PH E ACIDEZ DOS LEITES FERMENTADOS	17
3.2 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS NOS LEITES FERMENTADOS.....	18
4. CONCLUSÃO.....	19
5. REFERÊNCIAS	19
5. CONCLUSÃO	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
ANEXO	26

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os leites fermentados são produtos obtidos mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, que podem incluir *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e/ou outras bactérias lácticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2007). Algumas dessas bactérias podem ser classificadas como probióticas, por serem capazes de conferir benefícios a saúde, quando ingeridas em quantidades adequadas (FAO, 2002).

Dentre os benefícios estão incluídos o alívio dos sintomas da intolerância à lactose, modulação do sistema imune e da microbiota intestinal, efeito hipocolesterolêmico e ação anticarcinogênica, entre outros (SHAH, 2007; ROWLAND et al., 2010).

A indústria brasileira de produtos lácteos tem explorado bastante o potencial das bactérias probióticas, sendo estas comumente adicionadas em leites fermentados. Esse alimento é considerado um veículo adequado, por apresentar boa capacidade tamponante e pH na faixa de 3,5-4,5, que contribui para o aumento do pH do estômago e, conseqüentemente, melhora a sobrevivência dos probióticos (CHARALAMPOPOULOS et al., (2003). Dentre as bactérias lácticas probióticas, a mais usada em todo o mundo é o *Lactobacillus acidophilus*, entretanto o grupo *Lactobacillus casei* possui também importante valor comercial para a indústria de alimentos. Fazem parte desse grupo as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus* (BURITI e SAAD, 2007).

Para que os benefícios atribuídos ao consumo de bactérias probióticas sejam assegurados, algumas condições devem ser atendidas. Primeiro, a bactéria probiótica deve ser devidamente caracterizada e identificada ao nível de linhagem e não somente ao nível de gênero e espécie, pois segundo Rowland et al., (2010) um determinado efeito apresentado por uma linhagem não pode ser extrapolado para as demais bactérias da mesma espécie. Na legislação brasileira tem sido exigida somente a identificação do probiótico ao nível de espécie (BRASIL, 2008). Com relação aos produtos disponíveis no mercado, a maioria das marcas de leites fermentados não contém a alegação de que adicionam probióticos, mas informa a espécie de bactéria adicionada, entretanto, algumas marcas colocam somente que o produto contém lactobacilos vivos.

Outro fator importante é a dose ingerida. Segundo Granato et al., (2010), a quantidade diária mínima deve ser 10^8 ufc, enquanto a ANVISA estabelece a faixa de 10^8 - 10^9 ufc (BRASIL, 2008). Para leites fermentados, essas recomendações poderão ser alcançadas quando 100 mL de produto contendo, no mínimo, 10^6 ufc/mL de probiótico for consumido. Essa concentração é a quantidade mínima por mL exigida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2007) e também é a recomendada por Shah (2007).

Alguns fatores podem dificultar a manutenção do número de bactérias lácticas recomendado em leites fermentados destacando-se dentre eles a acidez do produto, a concentração de oxigênio presente no interior da embalagem, bem como a temperatura e o tempo de estocagem (SHAH, 2007). Durante o tempo de prateleira, que pode ter uma variação de 30 e 70 dias, dependendo da marca do produto, os microrganismos devem se mostrar viáveis, em abundância e ativos. A legislação brasileira estabelece uma faixa de acidez de 0,6 – 2,0g de ácido láctico/100g de produto (BRASIL, 2007).

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a influência do tempo de estocagem na viabilidade de bactérias lácticas presentes em três marcas de leites fermentados comerciais, bem como certificar-se de que as marcas avaliadas contêm o número mínimo desses microrganismos estabelecidos na legislação brasileira.

O trabalho foi publicado pelo III Encontro de Ciência e Tecnologia de Alimentos que foi realizado entre os dias 17 a 20 de Outubro de 2017, na cidade de Garanhuns – PE, na Revista Brasileira de Agrotecnologia (REBARGRO) ISSN 2317-3114, seguindo as normas exigidas pela comissão científica do evento que estão dispostas em anexo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Leites Fermentados

Entende-se por leites fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes microrganismos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2007).

De acordo com a legislação, os cultivos ou microrganismos empregados na fermentação definem a denominação do produto que pode ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada. O leite fermentado ou Cultivado, também pode ser denominado como um produto do qual a fermentação é procedida dos seguintes cultivos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* sp, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* e/ou outras bactérias ácido lácticas que, determinam características do produto final (BRASIL, 2007).

O consumo de leites fermentados tem sido correlacionado com diversos benefícios a saúde do consumidor. Isto se deve principalmente à ação das bactérias lácticas adicionadas a esses produtos. Esses benefícios são dependentes de alguns fatores, destacando-se dentre eles o tipo e a quantidade de bactéria láctica adicionada, sendo classificadas como probióticas aquelas que comprovadamente exercem tais benefícios (FAO/WHO, 2002; QUINTO et al., 2014).

3.2 Bactérias lácticas

Bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos, em forma de cocos ou bacilos não esporulados, catalase-negativos, aeróbicos facultativos ou anaeróbios, que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (HAYEK & IBRAHIM, 2013).

Apesar das bactérias lácticas representarem diversos gêneros, elas podem ser divididas em dois grandes grupos: heterofermentativas e homofermentativas, a partir do produto final da fermentação. As heterofermentativas produzem além do ácido láctico, substâncias como o dióxido de carbono, etanol, e ácido acético, através da fermentação

da glucose. Enquanto que as homofermentativas produzem o ácido láctico como principal produto a partir da fermentação da glucose (CARR et al., 2002).

Além da grande importância para a indústria, algumas das bactérias ácido lácticas exercem destaque na saúde pública, por estarem incursas como causadores etiológicos de doenças como endocardites, septicemia em pessoas com o sistema imunológico debilitado (CARR et al., 2002).

Algumas bactérias lácticas são designadas como probióticas, pois quando ingeridas em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Alguns desses benefícios estão ligados ao alívio dos sintomas da intolerância à lactose, modulação do sistema imunológico e microbiota gastrointestinal, e também, ação anticarcinogênica, entre outros (SANDHOLM et al., 1999; QUINTO et al., 2014).

Para garantir que esses benefícios sejam alcançados, é necessário haver o consumo regular de produtos com probióticos, sendo observadas diferentes recomendações quanto a quantidade administrada. Em caso de ingestão diária de 100 g de leite fermentado, a quantidade recomendada para ter efeito benéfico a saúde é de pelo menos 10^7 UFC/g de produto. Entretanto, outros autores recomendam valores na ordem de 10^5 - 10^6 (VINDEROLA e REINHEIMER, 2000).

A legislação brasileira preconiza que a contagem de bactérias probióticas viáveis deve ser entre 10^8 e 10^9 UFC/g, mas contagens menores podem ser empregadas se comprovado o seu benefício. A alegação para produtos contendo probióticos deve indicar a espécie do microrganismo (probiótico) presente que contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Também deve ser declarado que o consumo do produto deve estar associado a alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. (BRASIL, 2008). Quando não houver alegação de que o produto contém bactérias lácticas probióticas, o número mínimo exigido na Instrução Normativa 46, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento é de 1×10^6 UFC/g de produto (BRASIL, 2007).

Para ser aplicada como probiótico, a bactéria precisa resistir à acidez gástrica e à ação dos sais biliares e ter capacidade de adesão ao epitélio intestinal, entre outras. (Shortt, 1999).

As espécies de bactérias lácticas de maior interesse são *Lactobacillus acidophilus* e *L. casei*. O grupo *Lactobacillus casei* é o mais utilizado na produção de leites fermentados devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal (VINDEROLA e REINHEIMER, 2000).

3.3 Fatores que influenciam na viabilidade das bactérias lácticas

A utilização de bactérias lácticas probióticas em processamento de alimentos deve se manter viáveis durante todo o tempo de armazenamento. A aplicação de culturas probióticas, segundo Parvez et al. (2006), pode gerar compostos antimicrobianos, melhoria do produto lácteo pela liberação de aminoácidos, produção de compostos aromáticos, entre outros. Esses requisitos representam desafios uma vez que estas bactérias são sensíveis à exposição ao calor, práticas de inoculação, interações entre espécies, ácido e oxigênio (STANTON et al., 2005; GALLINA et al., 2011).

A sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício é fundamental para que sejam alcançados os benefícios previstos a saúde do consumidor, sendo necessária a manutenção de populações suficientemente elevadas desse grupo de microrganismos (tipicamente acima de 10^6 UFC/ ml ou g) nos leites fermentados.

A viabilidade das bactérias lácticas em leites fermentados é afetada por diversos fatores tais como acidez do produto final, presença de peróxido de hidrogênio e de oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação, condições de fermentação e estocagem (especialmente temperatura e tempo) e da disponibilidade de nutrientes, fatores de crescimento e inibidores, entre outros (SHAH, 2000).

Dentre esses fatores, destaca-se a acidez do produto final, considerada como a principal causa da redução no número de bactérias lácticas durante a estocagem (SHAH, 2000). Entretanto, esse fator é fortemente influenciado pelo tipo de bactéria láctica adicionada ao produto. Urnau et al. (2012) verificaram boa sobrevivência de *Lactobacillus paracasei*, isolado de leite fermentado comercial, após exposição a pH 3,0, por 6 horas. Lankaputhra e Shah (1995) verificaram que *L. acidophilus* sobrevive bem quando exposto a pH 3,0.

A adição de proteínas ao leite fermentado aumenta a sua capacidade tamponante, retardando a queda de pH e impedindo a sua modificação durante seu armazenamento, auxiliando por maior período de tempo a sobrevivência das cepas probióticas (SVENSSON, 1999; LOURENS-HATTINGH, VILJOEN, 2001). No caso de microrganismos, como as bifidobactérias, a presença de oxigênio interfere na sua subsistência (STANTON et al., 2003), utilizando como critério para seleção de algumas cepas a capacidade de sobrevivência em meios acidificados e aerobiose (KOMATSU, 2008).

4. ARTIGO CIENTIFICO

VIABILIDADE DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS EM LEITES FERMENTADOS COMERCIAIS

Viability of probiotic lactic bacteria in commercial fermented milks

Joellington Marinho Almeida, Janne Morais, Genilson Batista Oliveira, Gêssica Alexandre Barros, Janeeyre Ferreira Maciel

RESUMO: *O presente estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade de bactérias lácticas probióticas em três leites fermentados comerciais a fim de se certificar que os mesmos continham a quantidade mínima desses microrganismos informadas em seus rótulos e/ou exigida na legislação brasileira. Para isso, foi realizada a contagem de bactérias lácticas totais em placas, utilizando-se o ágar MRS. Ainda, foram determinados pH e acidez. Todas as amostras continham bactérias lácticas em números acima de 10^7 ufc/mL, estando adequadas quanto aos requisitos avaliados. A acidez das amostras variou de 1,0% a 1,57% de ácido láctico, estando todas de acordo com as exigências da legislação. Com relação ao pH, os valores observados variaram de 3,5 a 4,0, intervalo considerado adequado para esse tipo de produto, e com valores próximos dos relatados por outros autores. Portanto, números adequados de bactérias probióticas viáveis foram mantidos durante todo o tempo de estocagem refrigerada dos produtos pesquisados.*

Palavras-chave: *Acidez, Produto lácteo, Legislação.*

ABSTRACT: *The present research had as aim to evaluate the viability of probiotic lactic bacteria in three commercial fermented milks in order to make sure that they contained the minimum amount of these microorganisms reported in their labels and / or required by Brazilian legislation. For this, total lactic acid bacteria were counted in plates using MRS agar. Also, pH and acidity were determined. All samples contained lactic acid bacteria in numbers above 10^7 cfu / mL being adequate with respect to the evaluated requirements. The acidity of the samples ranged from 1.0% to 1.57% of lactic acid, all being in accordance with the legislation. In relation to the pH, the observed values ranged from 3.50 to 4.40, interval considered adequate for this type of product, and with values close to those reported by others authors. Therefore, numbers of viable probiotic bacteria were kept during all refrigerated storage time of these products.*

Palavras-chave: *Acidity, Dairy product, Legislation.*

1. INTRODUÇÃO

Os leites fermentados são produtos obtidos mediante a ação de cultivos de microrganismos específicos, que podem incluir *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus*

e/ou outras bactérias lácticas que por sua atividade contribuam para a determinação das características do produto final (BRASIL, 2008). Algumas dessas bactérias podem ser classificadas como probióticas, por serem capazes de conferir benefícios a saúde que incluem o alívio dos sintomas da intolerância à lactose, modulação do sistema imune e da microbiota intestinal, efeito hipocolesterolêmico e ação anticarcinogênica, entre outros (ANTUNES et. al., 2007; SHAH, 2007; MAZOCHI et. al., 2010; ROWLAND et. al. 2010; MELO, et. al. 2016).

Para que esses benefícios sejam assegurados, as bactérias probióticas deverão ser ingeridas regularmente, em quantidades adequadas (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; ZUCCOTTI et al., 2008; ROWLAND et al., 2010). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, essa quantidade deve ser informada pelo fabricante, no rótulo do produto, juntamente com a ação alegada, devendo ser mantida durante todo o seu prazo de validade (BRASIL, 2008). Entretanto, alguns fatores tais como acidez, temperatura e tempo de estocagem podem afetar a viabilidade dessas bactérias, fazendo com que os produtos não atendam ao estabelecido no rótulo (BURITI e SAAD, 2007; LAGO, 2009; MAZIERO, et. al. 2011; GUTIERREZ, et. al. 2012). Por essa razão, faz-se necessário o monitoramento frequente desses alimentos de modo a assegurar ao consumidor de que as informações fornecidas em seus rótulos estejam sendo atendidas.

Nesse estudo, a viabilidade de bactérias lácticas foi avaliada na metade e no final do prazo de validade de leites fermentados comerciais a fim de se verificar que os mesmos continham o número mínimo alegado em seus rótulos e estabelecidos na legislação brasileira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de três marcas de leites fermentados desnatados adoçados comerciais (A, B e C) de diferentes lotes, foram adquiridas em supermercados de João Pessoa-PB, no período de abril a agosto 2017 e transportadas, em caixas isotérmicas contendo gelo, até o laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba-UFPB, sendo mantidas sob refrigeração a 5°C até o momento das análises. No total, foram realizadas cinco coletas, sendo obtida uma amostra de cada marca, por coleta. Cada amostra consistiu de um conjunto contendo 6 frascos, com 75-80 g de produto. Com base nas informações dos rótulos, dois produtos alegaram conter probióticos, tendo o produto A informado a quantidade mínima de 10^{10} unidades formadoras de colônias por unidade (ufc/unidade) e o produto B de 10^8 unidades formadoras de colônias por unidade (ufc/unidade). Todas as amostras foram submetidas à contagem total de bactérias lácticas e as análises de potencial hidrogeniônico (pH) e acidez, no (1/2) meio e fim de seu prazo de validade.

2.2 DETERMINAÇÃO DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH) E ACIDEZ

O potencial hidrogeniônico (pH) foi determinado utilizando-se potenciômetro previamente calibrado, introduzindo-se o eletrodo diretamente em cerca de 50 mL da amostra homogeneizada em um béquer de 100 mL. A acidez foi obtida por titulação de alíquotas de 10 g de amostras de leite fermentado homogeneizadas em 10 mL de água destilada, com solução de hidróxido de sódio N/9 (Normal/9), em presença do indicador

fenolftaleína, sendo os resultados expressos em g de ácido láctico/100 g (BRASIL, 2006).

2.4 CONTAGEM DE BACTÉRIAS LÁTICAS TOTAIS

Amostras foram submetidas às diluições decimais seriadas, utilizando água peptonada 0,1%, tendo sido selecionadas as diluições de 10^{-4} a 10^{-9} para serem submetidas a contagem em placas, pela técnica de semeadura em profundidade. O meio de cultura utilizado foi o ágar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) e as placas foram semeadas em duplicata, por diluição. Após solidificação do meio, foi acrescentada sobre este uma camada de cobertura contendo o mesmo meio, a fim de criar uma atmosfera microaeróbia. As placas foram incubadas a 37°C, por 48-72 horas. Após incubação, fez-se a contagem das colônias, sendo isolados todos os diferentes tipos que ocorreram nas placas, para serem submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase (APHA, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 DETERMINAÇÃO DE PH E ACIDEZ DOS LEITES FERMENTADOS

Os resultados das análises de pH e acidez dos três leites fermentados pesquisados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 Resultados das análises de pH e acidez das três marcas de leites fermentados comercializados em João Pessoa-PB.

Repetição	Produto A				Produto B				Produto C			
	pH		Acidez		pH		Acidez		pH		Acidez	
	1/2	Fim	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final	1/2	Final
R1	3,60	3,60	1,02	1,13	3,90	3,90	1,34	1,35	3,6	3,5	1,10	1,10
R2	3,60	3,50	1,09	1,57	3,90	3,80	1,25	1,38	3,8	3,5	1,14	1,16
R3	3,80	3,60	1,08	1,09	3,90	3,80	1,25	1,29	3,5	3,5	1,00	1,05
R4	3,50	3,50	1,12	1,20	4,00	3,90	1,15	1,20	3,7	3,6	1,14	1,18
R5	3,50	3,50	1,10	1,20	4,00	3,90	1,20	1,25	3,8	3,7	1,19	1,30
Média	3,60	3,54	1,06	1,17	3,94	3,86	1,24	1,29	3,7	3,6	1,10	1,20
Desvio	0,12	0,05	0,04	0,23	0,05	0,05	0,07	0,07	0,14	0,09	0,09	0,09

Os valores de pH das amostras variaram de 3,5 a 4,0, estando todos situados dentro do intervalo considerado satisfatório para alimentos veículos de bactérias probióticas. Segundo Charalampopoulos et. al. (2003), alimentos com pH na faixa de 3,5 a 4,5 e com alta capacidade tamponante tais como leite e produtos lácteos irão contribuir para o aumento no pH do estômago, favorecendo a maior sobrevivência das bactérias probióticas nesse ambiente. Em outros estudos sobre pH de leites fermentados também foram encontrados valores dentro desse intervalo, variando de 3,6 a 4,4 (GRANATO, 2008; LAGO, 2009; MAZIERO, et. al. 2011).

Quanto à acidez, os valores observados situaram-se entre 1,00% - 1,57% de ácido láctico. De acordo com a legislação brasileira, os limites estabelecidos são mínimo de 0,6 e

máximo de 2% de ácido láctico (BRASIL, 2008). Com base nesses padrões, todas as amostras analisadas estavam com acidez adequada. Os resultados de outras pesquisas também demonstraram adequação na acidez de leites fermentados (FARIAS et. al. 2012; GUTIERREZ et. al., 2012), tendo sido encontrado somente um estudo, conduzido por Castilho et. al. (2013), que obteve amostras fora do padrão, com valores abaixo de 0,6% de ácido láctico.

3.2 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS NOS LEITES FERMENTADOS

Os resultados das contagens de bactérias lácticas probióticas nos três marcas de leites fermentados avaliados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Resultado da contagem total de bactérias lácticas em três leites fermentados comercializados em João Pessoa-PB.

Repetição	Produto A		Produto B		Produto C	
	1/2	Fim	1/2	Fim	1/2	Fim
1	$4,9 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$1,1 \times 10^8$	$8,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$2,5 \times 10^7$
2	$2,5 \times 10^9$	$2,7 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$6,1 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$
3	$1,1 \times 10^9$	$6,7 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$4,8 \times 10^7$
4	$1,0 \times 10^{10}$	$5,8 \times 10^9$	$5,9 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
5	$8,5 \times 10^9$	$9,0 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$

Todos os produtos analisados apresentaram contagens de bactérias lácticas probióticas acima de 10^7 ufc/mL, atendendo, portanto, a exigência da legislação (10^6 ufc/mL de produto) (BRASIL, 2007). Com relação às quantidades mínimas alegadas nos rótulos, os produtos A e B cumpriram esse requisito na totalidade de suas amostras, tendo o produto A alcançado a quantidade mínima de $2,7 \times 10^8$ ufc/mL (Tabela 2), correspondente a $2,2 \times 10^{10}$ ufc/80 g de produto e o produto B obtido $8,2 \times 10^7$ ufc/mL (Tabela 2), correspondente a $6,2 \times 10^9$ ufc/ 75 g de produto. Quanto ao produto C, contagens elevadas também foram observadas, acima de 10^7 ufc/mL, (Tabela 2). Esse produto também foi adicionado de uma bactéria probiótica, porém não tinha nenhuma alegação em seu rótulo, nem informação quanto a quantidade mínima disponível por unidade do produto. Com base nesses resultados, os prazos de validade adotados pelos fabricantes podem ser considerados satisfatórios, garantindo a manutenção de números adequados de bactérias probióticas viáveis durante todo o tempo de estocagem refrigerada dos produtos.

Em outros estudos sobre viabilidade de bactérias lácticas em leites fermentados comerciais, os resultados encontrados também demonstraram adequação dos produtos quanto a esse requisito. Segundo Lago (2009), leites fermentados com até 60 dias de validade continham bactérias lácticas na ordem de 10^7 ufc/mL ou mais, mesmo no final de seu prazo de validade. Barreto et. al. (2003) também verificaram boa viabilidade das bactérias lácticas em leites fermentados no final de seu prazo de validade (até 60 dias). Entretanto, Castilho et. al. (2013) verificaram que 3 das 5 marcas de leites fermentados comercializadas em Viçosa-MG apresentavam amostras com contagens de bactérias lácticas abaixo do mínimo exigido na legislação (10^6 UFC/mL). Esses autores foram os

únicos que utilizaram incubação aeróbica para as bactérias lácticas, condição que dificulta o desenvolvimento desses microrganismos, enquanto os demais autores citados usaram plaqueamento em profundidade, com incubação em condições microaerofílicas ou incubação em jarra de anaerobiose.

4. CONCLUSÃO

As três marcas de leites fermentados analisados nessa pesquisa continham números de bactérias lácticas em conformidade com a Resolução nº 43, de 23 de Outubro de 2007 do MAPA, que estabelece uma contagem mínima de 10^6 UFC/g, além de estarem adequadas quanto à acidez. Foi verificado também que as marcas A e B cumpriram as alegações descritas em seus rótulos, referentes às quantidades de bactérias lácticas probióticas/unidade do produto, atendendo, portanto as exigências previstas na Resolução nº 02, 07 de Janeiro de 2002. Portanto, os prazos de validade estabelecidos pelos fabricantes possibilitaram a manutenção de elevados números de bactérias probióticas viáveis nos leites fermentados durante todo seu tempo de estocagem refrigerada, condição essencial para assegurar os benefícios à saúde propostos com o consumo desses produtos.

5. REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 4. ed. Washington: APHA, 2001.

ANVISA. **Resolução-RDC ANVISA nº 02, 07 de Janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde, e dá outras providências. ANVISA, 2002.

ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LARAYER, A. L. S. **Desenvolvimento de buttermilk probiótico**. Ciência Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobactérias e Bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p.119 -126. 2003.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. **Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana**. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Vol. 57 Nº 4, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 out. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, Apresenta as**

alegações de propriedades funcionais aprovadas pela ANVISA. Atualizado em Julho 2008.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International Journal of Food Microbiology** 82. 133 – 141. 2003.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAÚJO, M. M. P. **Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista in vitro de suas bactérias ácido lácticas.** B. Ceppa, v.31, n.2, p.207-214, 2013.

FARIAS, M. M. A. G.; OZELAME, S. B.; SCHIMITT, B. H. E.; CAPRISTANO, D. F.; SILVEIRA, E. G. **Avaliação da Acidez de Diversas Marcas de Leite Fermentado Disponíveis Comercialmente.** Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, João Pessoa, vol. 12, núm. 4, pp. 451-455. out./dez., 2012.

GRANATO, D. Parâmetros físico-químicos de leites fermentados com bactérias probióticas comercializados em Curitiba (PR). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n. 361, v.63, p. 39-46, 2008.

GUTIERREZ, E. M. R.; ZIBORDI, G.; SOUZA, M. C. Avaliação Físico-Química e Sensorial de Leites Fermentados Probióticos. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, Jan/Fev, nº 384, 67: 22-29, 2012.

LAGO, A. M. S. **Avaliação do padrão de identidade e qualidade de leites fermentados probióticos.** Dissertação. Universidade Federal da Bahia, 2009. 76p.

MAZOCHI, V.; JÚNIOR, F. E. M.; VAL, C. H.; DINIZ, D. N.; RESENDE, A. F.; NICOLI, J. R.; SILVA, A. M. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com Bifidobacterium spp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 6, p. 1484-1490, 2010.

MAZIERO, M. T.; TOLENTINO, M. C.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades sensoriais e físico-químicas de leites fermentados comerciais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, n.1, p.274-281, 2011.

MELO, T. A.; RIBEIRO-ALVES, M. A.; LAVINAS, F. C.; RODRIGUES, I. A. Levantamento e caracterização dos produtos probióticos disponíveis no mercado varejista da região metropolitana do Rio de Janeiro. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2016.

ROWLAND, I. R.; CAPRUSO, L.; COLLINS, K.; CUMMINGS, J.; DELZENNE, N.; GOULET, O.; MEIER, R. **Current level of consensus on probiotic science-Report of an expert meeting-** London, 23 November 2009, Gut Microbes 1:6, 436-439; Landes Bioscience; November/December 2010.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J Dairy Sci**; 83(4):894-907. 2007.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria a comparative “in vivo” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Essex, v. 36, n.9, p. 895-904, 2003.

ZUCCOTI, G. V.; MENEGHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA, E.; GIOVANNINI, M. **Probiotics in clinical practice: an overview**. Journal of International Medical Research, Northampton, v. 36, n.1, p.1-53, 2008.

5. CONCLUSÃO

Os leites fermentados analisados apresentaram contagens de bactérias lácticas probióticas acima do exigido na legislação brasileira (10^6 ufc/mL) e do especificado em seus rótulos, mesmo no final do prazo de validade dos produtos, após longo período de estocagem refrigerada. O pH e acidez desses alimentos também foram considerados satisfatórios, condição que contribui para a melhoria na sobrevivência das bactérias probióticas. A manutenção de números elevados desses microrganismos é essencial para que os benefícios propostos com o consumo de leites fermentados sejam alcançados, o que no caso das marcas avaliadas foi devidamente cumprido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**, 4. ed. Washington: APHA, 2001.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latino Americanos de Nutricion**. Vol. 57, n. 4, 373 – 380p, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006: **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**; 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 24 out. 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**, 2008.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, 2002.

COSTA, M. P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. B. P.; CRUZ, A. G.; JÚNIOR, C. A. C. Leite Fermentado: Potencial Alimento Funcional. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 9, N. 16; p. 1387, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a joint food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2001.

FAO/WHO. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada; 2002.

GALLINA, D. A.; SILVA E ALVES, A. T.; TRENTA, F. K. H. S.; CARUSI, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida de Prateleira. **UNOPAR. Cient Ciênc Biol Saúde**, 2011;13(4): 239-44.

HAYEK, S. A.; IBRAHIM, S. A. **Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review**. **Food and Nutrition Sciences**, 4, 73-87, 2013.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista**

Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 44, n. 3, 2008

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, v.11, p.1-17, 2001.

MORAES, F. Alimentos funcionais e neutracêuticos: definições, legislação e benefícios a saúde. **Rev. Eletr. Farm.**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; CORRIEU, G. **Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria.** V.11, p.935-942, 2001.

PARVEZ, K.A.; MALIK, S.; KANG S.AH; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **J. Appl. Bacteriol.**, v.100, p.1171-1185, 2006.

QUINTO, E. J.; JIMÉNEZ, P.; CARO, I.; TEJERO, J.; MATEO, J.; GIRBÉS, T. **Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review.** **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p.1765-1775, 2014.

ROERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisted. **J. Nutr.**, v. 137, p. 830S-837S, 2007.

SANDERS, M. E. How do we know when something calles “probiotic is really a probiotic? A guideline for consumers and Health care Professionals. **Funct. Food Rev.**, v. 1, n. 1, p. 3-12, 2009.

SANDHOLM, T. M.; BLUM, S.; COLLINS, J. K.; CRITTENDEM, R.; VOS, W.; DUNNE, C.; FONDÉN, R.; GRENOV, G.; ISOLAURI, E.; KIELY, B.; MARTEAU, P.; MORELLI, L.; OUWEHAND, A.; RENIERO, R.; SAARELA, M.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; SCHIFFRIN, E.; SHANAHAN, F.; VAUGHAN, E.; VON, W.A. Probiotics: towards demonstrating efficacy. **Trends in Food Science and Tecnology**, v.10, p.393-399, 1999.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **J Dairy Sci**, 83(4):894-907, 2000.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **Int. Dairy J.**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHORTT, C. **The probiotic century: historical and current perspectives.** V. 10, 411-417, 1999.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD G.F.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). **Handbook of fermented functional foods.** Boca Raton: CRC Press, 27-58p., 2003.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.16, p.196-203, 2005.

SVENSSON, U. Industrial perspectives. In: TANNOCK, G.W. (Ed.) **Probiotics: a critical review**. Wymondham: Horizon Scientific Press, p.57-64, 1999.

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N. N.; CAVALHEIRO, C. P.; MILANI, L. I. G; FRIES, L. L. M. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 384, 67: 5-10, 2012.

VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C.; RESENDE, M. F. S.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo coalho. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 62, n. 2, p. 460-467, 2010.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal, Amsterdam**, v. 10, n. 4, p. 271-275, 2000.

WANG, Y.; JACOME-SOSA, M. M.; VINE, D. F.; PROCTOR, S. D. Beneficial Effects of Vaccenic Acid on Postprandial Lipid Metabolism and Dyslipidemia: Impact of Naturaltrans-fats to Improve CVD risk. **Lipid Techn.**, v. 22, p. 103-106, 2010.

ANEXO

Os trabalhos serão analisados pela comissão científica do evento, e será levado em consideração a aderência ao tema do evento, respeito as normas, qualidade e pertinência científica. Os trabalhos poderão ser escritos em português e deverão seguir as seguintes normas:

1. Texto elaborado no Microsoft Word;
2. Resumos que já foram publicados ou estão em avaliação em outros eventos ou revistas científicas, não deverão ser enviados. Os resumos aceitos deverão ser originais para serem publicados em periódicos.
3. O trabalho deve ser redigido em folha A4 (210 X 297mm), espaçamento simples, fonte Times New Roman (tamanho 12) e em texto justificado. Margens direita, esquerda, superior e inferior em 2,5cm.
4. As figuras e tabelas deverão estar inseridas no texto e não no final do documento.
5. Os resumos expandidos deverão ter no mínimo 5 e no máximo 7 laudas, incluindo tabelas, gráficos, referências bibliográficas, etc. Resumos maiores serão recusados.
6. Estrutura do resumo: título, resumo, abstract, palavras-chave (máximo 3); Introdução; Materiais e Métodos; Resultados e discussão; Conclusão; Agradecimentos (se necessário); Referências no formato ABNT.
7. Palavras estrangeiras deverão estar em itálico, assim como nomes científicos.